

Approved For Release STAT
2009/08/31 :
CIA-RDP88-00904R000100130

Dec

Approved For Release
2009/08/31 :
CIA-RDP88-00904R000100130



Вторая Международная конференция
Организации Объединенных Наций
по применению атомной энергии
в мирных целях

А. М. Кузин 23/9

В. Л. Шабдаш
Секретариат

25 YEAR RE-REVIEW

Не подлежит оглашению до официального сообщения на Конференции

О ЗНАЧИМЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ НАЧИНАЮЩЕГО СОСТОЯНИЯ НУКЛЕОПРО-
ТЕИДОВ В РАДИАЦИОННОМ ПОРАЖЕНИИ

А. М. Кузин, А. Л. Шабдаш

Первичный акт поглощения лучистой энергии веществом живого организма, приводящий к ионизации и возбуждению молекул, связан с видимым биологическим эффектом цепью преемственных процессов, возникающих в живом субстрате и формирующих так называемый "начальный этап" поражающего действия радиации. У нас нет оснований предполагать, что первичный акт поглощения энергии веществом живого организма существенно отличается от поглощения энергии веществом в мертвой природе; первичная ионизация и возбуждение молекул происходит, по-видимому, по тем же законам, которые установлены ядерной физикой и радиационной химией.

Следовательно, своеобразие воздействия ионизирующих излучений на живые организмы (своеобразие, заключающееся прежде всего в их высокой радиочувствительности) требует выяснения особенностей тех процессов, которые возникают вслед за первичной активацией вещества на начальном этапе поражающего действия радиации. Эта цепь превращений, как показывает опыт, медленно развивается в пострadiационный период и длится многие часы, приводя в конце концов к морфологическим и физиологическим нарушениям жизнедеятельности клетки.

В чем же заключается принципиальная особенность этого второго этапа в живых системах?

Существенной особенностью начальных процессов в живых системах является их локализация в определенных микроскопических и субмикроскопических структурах со строго упорядоченным расположением реагирующих субстратов. Характерным свойством такой организации является состояние динамического равновесия благодаря непрерывному обмену веществ. Упорядоченность вещества в структурах обуславливает слаженность обмена, а обмен веществ в свою очередь

2 -

поддерживает и делает возможным существование структуры в живом субстрате. Благодаря обмену веществ все структуры в живой системе (будет ли это клетка, ткань или весь организм) взаимосвязаны друг с другом, и любое изменение в одних структурах неизбежно вызывает нарушение процессов обмена в других. Нам кажется, что понять своеобразие протекания начального этапа радиационного поражения в живых системах нельзя, не учитывая этих особенностей живой системы.

В литературе имеются многочисленные попытки построить теорию биологического действия ионизирующих излучений, исходя только из данных радиационной химии, игнорируя выше отмеченные особенности живых систем. Эти попытки, базирующиеся на изучении действия радиации на гомогенные растворы, безводные системы, изолированные белки, жиры, ферменты и др. вещества, хотя и дали много ценного для понимания вопроса, неизбежно приводили к односторонним гипотезам, не отражающим тех сложных взаимодействий, которые имеют место в действительности.

Недостатком других подходов к проблеме являлось полное отвлечение от реальных процессов, происходящих в облученной живой системе, и попытки создать теорию процесса только на основании количественных сопоставлений параметров физического воздействия с конечной биологической реакцией (например, смертью организма), являющейся, как правило, результирующей многих событий, происходящих как внутри живого организма, так и в его взаимоотношениях с внешней средой. Эти формальные подходы, дававшие общие представления о характере течения процесса, не могли вскрыть его механизмов и дать какие-либо указания о возможных путях вмешательства в его течение.

Третье направление, все более привлекающее в настоящее время внимание исследователей, ставит своей задачей изучение процессов, возникающих и развивающихся под влиянием облучения в различных микроструктурах живой клетки, взаимосвязи этих процессов, особенностей нарушения состояния и обмена веществ, упорядоченно расположенных в этих структурах. В настоящей работе нам казалось интересным обобщить ряд экспериментальных исследований, проведенных нами в двух направлениях: биохимическая группа радиобиологической лаборатории Института биологической физики АН СССР под руководством А.М.Кузина изучала физиолого-химические

- 3 -

процессы, а цитологи под руководством А.Л.Шабдаша исследовали гистохимические преобразования клеток и их органоидов.

Исходя из представлений о ведущем значении в радиационном поражении нарушений состояния и обмена нуклеопротеидов /работы Эррера (1), Ларионова (2), Кузина (3), Батлер с сотр. (16), Бак и Александер (9) и др./, необходимо было уточнить взаимосвязи неодинаковой радиочувствительности различных органоидов клетки с уровнем содержания в них нуклеиновых кислот и функциональным состоянием последних. При этом, конечно, ясно, что как ни велика роль изменений нуклеиновых соединений в клетке в радиобиологической реактивности, один этот признак не исчерпывает всей совокупности сложных процессов биологического ответа.

Изученный нами материал дан в виде ответов на ряд вопросов, отчасти развивающих имеющиеся в литературе проблемы, отчасти ставящих их заново. Для выяснения роли и значения нуклеопротеидов в возникновении и развитии лучевого поражения существенно знать:

1) характерно ли наличие нуклеиновых кислот в радиочувствительных органоидах клетки и существует ли (в первом приближении) пропорциональность степени радиационного повреждения и содержания нуклеиновых соединений? Ответ дан в опытах с облучением хлоропластов растительных клеток;

2) значение полимерного состояния дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) ядра для цитоплазматических процессов, в частности для окислительного фосфорилирования в митохондриях (опыты с изолированными митохондриями печени);

3) удельная роль в радиационной реактивности цитоплазматических нуклеопротеидов, выявляемая гистохимическими методами;

4) относительная радиочувствительность митохондрий, ядрышка и эргастоплазмы в связи с физико-химическими особенностями их рибонуклеопротеидов (РНК);

5) связь неодинаковой радиочувствительности органоидов животной клетки (при сравнимом содержании ДНК или РНК) с функциональным состоянием нуклеопротеидов, в частности с их изоэлектрической точкой (ИЭТ).

Излагаемые ниже результаты характеризуют, как нам кажется, ряд важных сторон участия нуклеопротеидов в радиобиологических реакциях.

Для уточнения первого из вопросов было интересно исследовать функциональную радиочувствительность хлоропластов растительных

v 833

- 4 -

клеток, содержащих сравнительно малое количество нуклеиновых кислот (0,3-3,5) /Сисакян (5а)/, поскольку исключительная радиочувствительность хромосом ядра, содержащих 20-38% ДНК, или митохондрий, имеющих 5-8% РНК, широко известна.

Проведенные исследования /Кузин, Сунь-Чи, Саенко (37)/ функциональной активности хлоропластов, определяемой по интенсивности фиксирования радиоактивной CO_2 , показали, что даже облучение 20 000 р (X- и γ -лучи) не отражается на фотосинтетической активности хлоропластов. При повышении дозы до 50 000 р наблюдалась различная радиочувствительность хлоропластов разных растений: в то время как у радиочувствительного растения (например, у традесканции) при этих дозах уже наблюдалось значительное угнетение фотосинтетической активности (до 80%), у более радиустойчивых растений (табак *Nicotiana glauca*, фасоль) не отмечалось достоверного угнетения фотосинтеза.

Исследование радиочувствительности хлоропластов у традесканции показало, что тотчас же после облучения (50 000р) фотосинтез практически не нарушен. Через 3 часа после облучения выявляется слабое снижение фотосинтеза (на 13%); это снижение прогрессирует и через 24 и 48 час. оказывается уже на 50 и 80% ниже нормы. Ход изменений соответствует не раз описанному в литературе постепенному ходу деполимеризации нуклеиновых кислот в облученных тканях.

Желая подтвердить зависимость между радиочувствительностью хлоропластов и малым содержанием в них нуклеиновых кислот, мы исследовали радиочувствительность и содержание нуклеиновых кислот в хлоропластах молодых и старых листьев традесканции: было найдено, что хлоропласты более молодых листьев содержат больше нуклеиновых кислот (2,5%) и оказываются более радиочувствительными, чем хлоропласты более старых листьев, содержащих меньше нуклеиновых кислот (1,2%) и оказавшихся более устойчивыми к воздействию радиации (см. таблицу). [Условия проведения экспериментов см. работу А.М.Кузина, Сунь-Чи и Г.Н. Саенко, (37)].

N 853

- 5 -

Функциональная радиочувствительность
хлоропластов традесканции

Объект исследования	Доза облучения, тыс. р	Содержание нуклеиновых кислот в хлоропластах, %	Сравнительная активность фотосинтеза в % к контролю		
			время после облучения		
			3 часа	24 часа	48 час.
Молодые листья традесканции (2-3-й ряд от конца ветви)	20		100	99,6	91,9
	50	2,56; 2,28	87	32	18
Более старые листья традесканции (7-18-й ряд от конца ветви)	20		100	100	100
	50	1,96; 2,02	100	54	16

Проведенные исследования показывают значительную функциональную устойчивость клеточных образований (хлоропластов) с малым содержанием нуклеиновых кислот. Большая радиочувствительность хлоропластов в молодых листьях, быть может, стоит в связи с более интенсивно протекающим в них обменом ДНК в делящихся ядрах клетки, во всяком случае, определенный количественный уровень содержания нуклеиновых соединений является предпосылкой и первым условием, предопределяющим участие тех или иных органоидов клетки в реактивном ответе на проникающие излучения.

Второй вопрос - выяснение роли полимерного состояния ДНК ядер в радиационном поражении цитоплазмических структур - был исследован нами при изучении окислительного фосфорилирования митохондрий, выделенных из печени облученного животного. Еще в 1955 г. Орд и Штокан (4) показали, что угнетение окислительного фосфорилирования в митохондриях наблюдается только при облучении *in vivo*; облучение изолированных митохондрий (дозы 300 - 1600 р) не вызывает падения из активности. Возникло предположение о наличии связей, существующих в живой клетке, между нарушениями состояния и обмена ДНК в ядре клетки и изменением функциональной активности митохондрий.

В литературе имеются отдельные косвенные указания на воз-

- 6 -

мжность такой связи. Так, Пинхот (5), исследуя окислительное фосфорилирование у *Alkaligenes faecalis*, показал, что оно идет только в присутствии полинуклеотида, участвующего в окислительном фосфорилировании в качестве составной части ферментной системы. Критский (6), работая с гомогенатами печени голубя, наблюдал, что добавление ДНК увеличивало переход неорганического фосфора в органофосфорное соединение, ближе автором не идентифицированное. Олфри и Мирский (38) сообщили о значении ДНК и некоторых полинуклеотидов для окислительного фосфорилирования в изолированных ядрах тимуса.

Исходя из представлений, развитых одним из нас (3), о роли изменения ДНК в радиационном поражении клетки представлялось интересным ближе изучить зависимость изменения окислительного фосфорилирования в тканях облученного животного от присутствия нативной высокополимерной ДНК. Работа в этом направлении была проведена Е.В.Будиловой. В опытах использовался препарат натриевой соли ДНК, которая получалась по методу Мирского и Поллистера (39); содержала 15% азота, 8% фосфора, а водные растворы ее обладали структурной вязкостью. В первой серии опытов, проведенной с препаратами печени контрольных необлученных животных, мы установили уровень окислительного фосфорилирования в наших условиях, представленный на рис. 1 первой группой столбиков (каждый столбик на всех рисунках это среднее между параллельными пробами в отдельном опыте). Добавление ДНК к этой взвеси митохондрий, содержащей небольшую примесь нормальных ядер, не приводило к какому-либо изменению уровня окислительного фосфорилирования. Во второй серии опытов было выяснено, что облучение крыс рентгеновыми лучами в дозе 1000 р приводит к угнетению окислительного фосфорилирования во взвеси митохондрий, полученной из печени этих животных через 24 часа после облучения, что соответствовало уже имеющимся в литературе данным (5). При этом дыхание ткани не менялось, связывание неорганического фосфора (рис. 1) и коэффициент Р/О (рис. 2) снижались в среднем более чем в 3 раза.

В следующей серии опытов к пробам, содержащим взвесь митохондрий печени облученных животных, добавлялась ДНК в количестве 2 мг на 2 мл инкубационной смеси. Оказалось, что в присутствии ДНК связывание неорганического фосфора в облученных пробах возрастало более чем в 2 раза по сравнению с такими же пробами без ДНК (см. рис. 1) и значительно возрастал коэффициент Р/О

- 7 -

(см. рис. 2).

Для проверки, связано ли наблюдавшееся исчезновение неорганического фосфора с дыханием, был поставлен ряд опытов в атмосфере азота. В этих условиях неорганический фосфор не исчезал ни в контрольных необлученных пробах, ни в облученных пробах с добавлением ДНК. Об окислительном характере наблюдавшихся процессов говорило также отсутствие связывания неорганического фосфора при добавлении в пробу 2,4-динитрофенола в концентрации 10^{-4} М. В последнем случае наблюдался даже небольшой прирост неорганического фосфора, связанный, по-видимому, с активацией фосфатазы. Следовательно, добавление нативной, высокополимерной ДНК в значительной мере стимулирует нарушенное при облучении окислительное фосфорилирование.

В последней серии опытов растворы ДНК за 24 часа перед опытом облучались γ -лучами Co^{60} в дозе 100 000 р, что приводило, в соответствии с литературными данными, к полному исчезновению структурной вязкости в изучавшихся растворах вследствие деполимеризации ДНК. Добавление облученных растворов ДНК (в тех же количествах, что и выше) к пробе, содержащей митохондрии облученных животных, не увеличивало связывания неорганического фосфора (см. рис. 1) и не повышало коэффициента Р/О (см. рис. 2).

На основании полученных данных можно сказать, что нативная необлученная ДНК способна стимулировать окислительное фосфорилирование во взвеси митохондрий печени облученного животного. Облучение раствора ДНК, вызывающее ее деполимеризацию и частичное разрушение, полностью снимает стимулирующее действие ДНК на окислительное фосфорилирование в этих условиях.

Полученные результаты указывают на наличие еще не выясненных связей, имеющих между ДНК ядра и окислительным фосфорилированием митохондрий и делают вероятным допущение, что изменения нуклеиновых кислот в результате облучения стоят в связи с одновременно идущим нарушением окислительного фосфорилирования в облученных клетках; к этому вопросу мы еще вернемся в заключительном разделе, анализируя данные Олфри и Мирского (38) о роли ДНК и РНК.

Третий вопрос - выяснение удельной роли цитоплазматических нуклеопротеидов в радиобиологических реакциях клеток - решался с помощью гистохимических методов. До недавнего времени основным цитологическим мерилем воздействия на клетки проникающих излуче-

- 8 -

нии служили изменения ядерного аппарата и феномен митоза, анализированные в разнообразных аспектах. Цитоплазма считается радиорезистентной, и ее участие в общем эффекте облучения учитывается совершенно недостаточно, лишь как сопутствующее вторичное явление (7, 8, 9). Наиболее убедительные доказательства роли ядра даны в работах последнего времени Б.Л.Астаурова (10) по оплодотворению яйцеклеток шелкопряда, утративших ядро в результате рентгенизации, полноценным спермием, а также Блома и Циркли (11) с локальным воздействием микропучка протонов (диаметром $2,5\mu$) на хромосомы или цитоплазму делящихся клеток культуры тканей сердца амфибий. Эти данные, как и наблюдения многих других авторов, безусловно справедливы для процесса деления клеток, когда ведущая роль преобразований не вызывает сомнений, оставляя в тени (хотя и не исключая) взаимосвязанные процессы в цитоплазме (миксоплазме).

Однако, во-первых, митоз является результатом общеклеточных превращений, во-вторых, длительность интеркинетического периода для многих типов клеток сложившегося организма такова, что реальность повреждения их ядерного аппарата в профазе или метафазе становится проблематичной. Так, например, клетки центральной нервной системы у взрослых особей, как правило, не делятся, хотя их реактивность к проникающим излучениям обнаружена объективными физиологическими методами /Н.И.Неменов (12), М.И.Ливанов (13), П.Б.Минаев (14), Н.И.Лившиц (15) и др. /.

Процессы в рибонуклеопротеидных компонентах (РНП) цитоплазмы и ядрышка выяснены совершенно недостаточно и лишь в единичных морфологических работах (18, 19, 20) содержится материал, конкретизирующий черты сходства изменений в РНП и ДНП в клетках, аналогичные данным их изучения при облучении в пробирках.

Известные и широкоиспользуемые в литературе цитохимические методы обнаружения РНП (например, окраска по Унна-Браше) слишком общи и нечувствительны для выявления тонких различий, возникающих в процессе жизнедеятельности клеток. В наших предыдущих работах дано теоретическое обоснование предложенного нового чувствительного метода и путей его практического осуществления (20, а, б, в; а, б, в); он основан на зависимости сорбции основных одновалентных красителей от конкретных значений изоэлектрической точки или "изоэлектрической зоны" (ИЭЗ) изучаемых тканевых коллоидов при мгновенном прижизненном выключении ферментов их

- 9 -

специфического расщепления в клетке. Связывание основных красителей нуклеопротеидами обусловлено наличием свободных фосфорнокислых групп и пропорционально их количеству и степени диссоциации. Усиление или уменьшение базофилии, которые большинством исследователей некритически расцениваются как соответствующее выражение количественных изменений субстрата, в действительности же являются результатом комплексных и притом существенно различных процессов: в одних случаях в их основе качественные изменения ДНП и РНП, связанные со степенью их полимеризации и комплексации с белками и др. противоионами, тогда как в других действительно имеет место нарастание или расходование субстрата. Окрашивание метиловым зеленым и пиронном по Унна-Паппенгайму (в том числе в модификациях Курника, Тафта и др.) не позволяет разграничивать в принципе различные видоизменения состояния или содержания ДНП и РНП в клетке. Между тем, как показали наши исследования /А.Л.Шабадаш (20)/, физиологические, фазовые состояния клеток отчетливее проявляются в качественных (а не только в количественных) особенностях нуклеопротеидов клеточных структур.

Учитывая резко выраженную полиэлектролитную природу ДНП и РНП, следует признать ИЭЗ важным признаком их функционального состояния, и поэтому предложенный гистохимический метод - пригодным для поставленной цели.

Взамен суммарных данных о локализации РНП, описанных в литературе с помощью методов Унна-Браше, абсорбции в ультрафиолетовых лучах и т.п., нами получены новые и конкретные данные о трех категориях РНП в рабочих клетках (в интеркинетическом периоде), которые различаются по своим физико-химическим характеристикам и локализованы в специфических органоидах /А.Л.Шабадаш (20)/.

Объектом изучения были различные органы кроликов, кошек, крыс, мышей и морских свинок, фиксированные прижизненной инъекцией в аорту и обработанные по описанной в предыдущих сообщениях технике (20).

Несмотря на существенные структурные и функциональные особенности, свойственные изученным нами клеткам различных тканей и органов, установлен принципиально единый тип размещения РНП в отдельных компонентах клетки. При физиологическом покое РНП с наименее низкими значениями ИЭЗ по шкале рН свойственны митохондриям, средние значения ИЭЗ наблюдаются в ядрышке и наиболее высокие ИЭЗ в эргастоплазме. Иначе говоря, каждая из обнаруженных нами

- 10 -

разновидностей РНП характеризуется особыми соотношениями диссоциированных фосфорнокислых групп, азотистых оснований и степенью комплексации с белками. Вскрытые новым гистохимическим методом закономерности подтверждены на нервной системе (А.Л.Шабадаш, С.Е.Левина, Н.Д.Аграчева), на печени, почках и слюнных железах (В.Е.Шунгская, А.Л.Шабадаш), на селезенке и лимфатических узлах (С.О.Енченко, Н.А.Краскина, А.Л.Шабадаш), на слизистой кишечника (Л.В.Орлова), на соединительной ткани и эпидермисе кожи (Р.Г.Цанев, А.Л.Шабадаш); отдельные значения ИЭЗ приведены нами в таблицах и тексте.

Действие ионизирующей радиации отчетливо изменяет физико-химическую характеристику РНП, локализованного в различных компонентах клетки. Облучение животных (даже однократно) рентгеном обуславливает высвобождение фосфорнокислых групп РНП из их связи с белками и, по-видимому, в результате деполимеризации или деструкции молекулы; эти превращения регистрируются гистохимически как сдвиг ИЭЗ. Первый процесс реализуется быстро, в минутах, второй более медленно (при ЛД₅₀ - ЛД₇₀ - в часах). Увеличение количества реактоспособных фосфорнокислых групп неодинаково в РНП митохондрий, ядрышка и эргастоплазмы и различно в изученных органах и даже в их частях (например, в нервной системе); однако общее направление процессов идентично и направлено в сторону закисления нуклеопротеидов.

Количественная характеристика сдвига ИЭЗ нуклеопротеидов в кислую сторону зависит от дозы облучения, от срока переживания животного и является органоспецифичной, т.е. параметры ее связаны с особенностями функции и метаболизма данного типа клеток и видом животного. Однако во всех изученных нами объектах смещение изоточки в кислую сторону неизбежно возникало на начальных этапах реакций на воздействие и, следовательно, служило диагностическим признаком происходящих в системе и в отдельных ее микроструктурах изменений. В качестве примера укажем, что, например, в клетках нервной системы сдвиг ИЭЗ тигроидного вещества достигает 0,2-0,3 единиц шкалы рН, а в митохондриях - 0,3-0,5 рН (20). Таким образом, на третий вопрос - об удельной роли цитоплазмы в радиобиологических реакциях - мы получили в гистохимических исследованиях сдвига изоточек ясный положительный ответ.

Особенно существенно, по нашему мнению, то, что различные - по физико-химической характеристике - категории РНП, размещен-

- II -

ние в конкретных структурах (митохондрии, ядрышко, эргастоплазма), неодинаково чувствительны к облучению; наиболее повреждаемы РНП митохондрий, затем РНП ядрышка, медленнее всего изменяются РНП эргастоплазмы.

Наиболее значимы сдвиги ИЭЗ в белковой основе митохондрий, в которых наблюдается повышенная сорбция катионов, "липкость" и агглютинация, набухание и в крайних случаях распад. Эти процессы нарушают исходную физиолого-химическую координацию биологических процессов, в частности вызывают изменения ферментативной активности митохондрий (в первую очередь системы циклофораз). Общеизвестная хрупкость митохондрий к любым повреждающим агентам - частный случай реактивности их РНП.

Существенно изменяются РНП ядрышка и относительно медленно нарастают изменения в эргастоплазме. Но в целом жизнедеятельность клетки осуществляется в особых, измененных условиях, так как сдвиги ИЭЗ свидетельствуют о существенных нарушениях в обычной комплексации ДНК и РНК с белками.

Констатируемая нами высокая реактивность РНП митохондрий коррелирует не только с общеизвестной поражаемостью этих структур, но и с недавними исследованиями Фриц-Нигли (21), которая, изучая лимоннокислый цикл, установила его нарушения при дозе 0,1 р. В ряде наших работ /Шабадаш (20), 1957, 1958) уже подчеркивался параллелизм видимых в микроскоп изменений морфологии митохондрий и изменений ферментативной активности, в первую очередь системы циклофораз; наши данные и наблюдения Фриц-Нигли полностью совпадают. Итак, во-первых, выявлен радиочувствительный компонент цитоплазмы в виде содержащих РНП структур, который свидетельствует об общей основе реактивности как ядра, так и цитоплазмы; во-вторых, установлена дифференциальная реактивность различных категорий РНП, пропорциональная количеству свободных фосфорокислых групп в них, или, иначе говоря, их ИЭТ. Таков ответ на четвертый вопрос.

Отчетливые гистохимические превращения РНП в клетках животных при действии ионизирующих излучений могут служить индикатором начальных реакций клеток в интеркинетическом периоде. Они указывают на вероятную общность механизмов, радиобиологических повреждений как в ядре, так и в цитоплазме: в обоих случаях в их основе лежат изменения нуклеопротеидов (ДНП и РНП). Наконец, сопоставление степени радиочувствительности клеток и гистохимической характеристики ее нуклеопротеидных структур приводит к новым

- 12 -

предоставлениям об условиях стигматизации к проникающим излучениям.

Содержание нуклеиновых кислот в клетке характеризует в общей форме их относительную чувствительность к ионизирующим облучениям. Выше уже приведены данные, сопоставляющие клеточные органеллы с высоким (хромосомы), средним (митохондрии) и малым (хлоропласты) количеством нуклеиновых соединений с их реактивностью. Однако помимо наличия нуклеиновых кислот, существенно функциональное состояние их комплекса с белками. Хотя ряд авторов (22, 23, 2, 8) считает, что радиационная ранимость тканей пропорциональна количественному уровню ДНК, с этим нельзя согласиться, и вот почему: точные химические и цитофотометрические определения количества ДНК в конкретных ядрах, осуществленные Вандрели и Вандрели (24), Вандрели и Буавеном (25), Свифтом (26) и др., показали, что во всех соматических клетках животных количество ДНК практически одинаково и для каждого семейства константно; у белой мыши, по Свифту, содержится в ядрах клеток печени (в 10^{-9} мг) 3,34 ДНК, в селезенке 3,20, в нервных клетках 3,14, в лимфоцитах 3,12; аналогичны результаты Вандрели: в печени быка 6,4, в зубной железе 6,6. Между тем лимфоциты и тимоциты крайне ранимы проникающими излучениями, а клетки печени относительно устойчивы. Оставляя в стороне вопросы количественных расхождений у авторов, отметим полное единство в их заключении о том, что количество содержащейся в ядрах ДНК коррелирует с количеством имеющихся в клетках хромосом; оно фактически одинаково в диплоидных соматических клетках и в половину меньше в гаплоидных, половых клетках. Из этого совершенно ясно, что никакой пропорциональности между количеством ДНК в ядрах различных клеток и их специфической повреждаемостью ионизирующими излучениями нет. Даже наоборот: половые клетки, обладающие только половинным количеством ДНК в ядрах, несравненно чувствительнее, чем соматические. Попытка объединения в системе координат обоих показателей (ранимости клеток и содержания ДНК в ядре в интерквинезе) бесполезна, так как результирующая кривая имеет хаотический характер.

Таким образом, представление о ведущем значении абсолютного количества ДНК в радиобиологическом эффекте требует уточнения.

Два года назад один из нас (Шабдашев) выдвинула рабочая гипотеза, которая за прошедшее время пополнилась рядом наблюдений и получает поддержку в результатах других исследований. Нами уста-

N 833

- 13 -

новлено, что как для клеточных ядер, так и для митохондрий существует корреляция между количеством свободных фосфатных групп в комплексном нуклеопротеиде и степенью повреждаемости клеток проникающими излучениями. Гистохимическим индикатором свободных фосфатных групп в ДНК и РНК, как уже указано, является сорбция катионного красителя в условиях ступенчатого ряда pH среды. Приводимая таблица, отдельные числовые значения которой зависят от деталей технологического процесса, однако с сохранением существа конечных выводов, свидетельствует, что исследованные тканевые клетки могут быть в основном разделены на три группы: средняя изoeлектрическая точка *) ядер в лимфоцитах соответствует pH 2,7, кишечного эпителия - pH 2,9 и тимоцитов - pH 3,0; эта группа характеризуется общим количеством свободных фосфорнокислых групп и чрезвычайной ранимостью ионизирующей радиацией; вторая группа нервные клетки - ИЭТ ядра при pH 3,5, клетки печени при pH 3,7, мышечные волокна при pH 3,8 - втрое и вчетверо менее радиочувствительны, а по логарифмической шкале pH отстоит на 0,5 - 0,8 что соответствует изменению в концентрации водородных ионов в 3-6 раз **); наконец, в третьей группе - ядра фиброцитов с ИЭТ при pH 4,6 при наиболее низкой повреждаемости этих клеток проникающими излучениями.

Кривая, соединяющая вершины столбцов на рис. 3, указывает на параллелизм радиочувствительности клеток ***)) и изоточки из ядер. Аналогичные результаты получены нами и для РНК митохондрий, хотя чрезвычайная лабильность этих органоидов и их изменчивость в связи с самыми разнообразными условиями жизнедеятельности клеток осложняет изучение и истолкование результатов. Ограничимся следующими примерами средних цифр: изоточка митохондрий лимфоцитов при pH 2,7, в нервных клетках при pH 3,3-3,5, в эпителии печени и

*) Несколько упрощая вопрос, мы приводим среднюю точку для зоны, охватывающей колебания в обе стороны на +0,1-0,18 шкалы.

**) Следовательно, количество "блокированных" фосфорнокислых групп в ДНК чрезвычайно увеличивается.

***)) Относительное количество поврежденных при ДД₁₀₀ клеток различных категорий совпадает с аналогичными данными, суммированными Блюмом (7), Холлендером (8), Баком (10) и др.

- 14 -

почек при pH 3,5 - 3,6; снова наблюдается описанная выше (для ДНК ядер) закономерность - наибольшее количество свободных фосфорнокислых групп в РНП митохондрий характерно для самых чувствительных к радиации клеток: лимфоциты > нервные клетки > клетки печени и почек (рис. 4). И, наконец, сопоставлению в пределах одной и той же категории клеток различных органоидов, содержащих РНП, показывает, что их повреждаемость параллельна типичному сдвигу ИЭТ в ряду: митохондрии > ядрышко > эргастоплазма.

Следовательно, само по себе наличие ДНК или РНК в той или иной структуре клеток предопределяет их "чувствительность" к проникающим излучениям, но относительная степень их повреждения ионизирующей радиацией зависит от функционального состояния нуклеопротеидов, характеризуемого относительной мерой комплексации с белками (иначе говоря, степенью их "блокады" или "защиты").

Реактивность высвобожденных из комплекса с белками нуклеиновых кислот существенное условие их повреждаемости.

Напомним убедительные данные Батлера (25) и др., что при действии ионизирующих излучений нуклеопротеидный комплекс значительно меньше деполимеризуется при прочих равных условиях, чем свободная нуклеиновая кислота, причем приводимые в его таблице кривые (с логарифмической шкалой изменений вязкости) ясно демонстрируют защитный эффект солеобразно присоединенного к ДНК гистона даже *in vivo*. В нашей лаборатории защитный эффект присоединяющегося к облучаемой молекуле белка (опыты проводились с мизоином и актином) показан Л.Х.Эйдусом и М.В.Каламкаровой (30), причем авторы объясняют наблюдавшийся ими результат миграцией энергии по межмолекулярным связям на "защитный" белок.

Процессы высвобождения нуклеиновых кислот из комплекса с белками, оцениваемые нами по количеству диссоциированных фосфатных групп, в той или иной мере отмечались внимательными исследователями: М.Н.Мейсель и Т.М.Кондратьева (18) описали с помощью люминесцентной микроскопии культуры тканей опухолей (правда, при очень высоких дозах облучения - 50 000 и выше), диффузию нуклеиновых соединений из ядер, а также из цитоплазмы в окружающую среду. Л.Ф.Ларионов, С.Е.Манойлов с сотр. (23) на основе биохимических анализов сарком крыс приходят к выводу, что облучение в дозе 4 000 р, осуществленное в течение 5 - 7 дней, обуславливает расщепление ДНК в ядрах клеток на белок и свободную нуклеиновую кислоту, которая при этом деполимеризуется.

- 15 -

Нами изучен один из признаков функционального состояния нуклеиновых кислот, а именно: степень их комплексации с белками. Но даже его учет позволил приблизиться к выяснению дифференциальной радиочувствительности различных структур. В работе Р.Г. Цанева и А.Л.Шабдава (34) дана гистохимическая характеристика и метод обнаружения клеточных ядер в профазе, которая, как известно, не всегда четко ограничивается от предшествующей стадии интеркинеза при обычных цитологических окрасках. Особенностью даже ранней профазы является сдвиг изоточек хроматиновых структур в кислую сторону, т.е. прогрессирующее высвобождение фосфорнокислых групп нуклеопротеидов. Мы разделяем общепринятую точку зрения на чрезвычайную ранимость клеток в периоде профазы, но расцениваем избирательность процессов как частное проявление тех общих закономерностей, которые сформулированы выше; т.е. радиобиологическое повреждение пропорционально степени дискомплексации нуклеиновых кислот с белками в сочетании с метаболическим индексом конкретных структур в данный период их жизнедеятельности. Следовательно, повреждение ядер в профазе проникающими излучениями обусловлено тем же механизмом их действия, что и на другие органоиды клетки: степень реактивности каждой структуры к проникающим излучениям коррелирует с физико-химическим состоянием свойственных им нуклеопротеидов, в частности с количеством свободных фосфорнокислых групп и, следовательно, с ИЭТ.

Наши представления, основывающиеся на гистохимическом изучении клеток, в сочетании с некоторыми исследованиями других авторов характеризуют общую тенденцию, которая все отчетливее пробивает себе дорогу в современной радиобиологии.

До недавнего времени внимание большинства радиобиологов сосредоточивалось на изучении изменений ядра клетки. Нарушения митотического цикла и хромосомные aberrации - давний и наиболее очевидный результат воздействия проникающих излучений. И тем не менее цитоплазме принадлежит существенная роль в осуществлении клеточной реактивности, так как в ней реализуются важнейшие метаболические превращения (в том числе накопление макроэргических соединений типа АТФ), подготовляющие и самый митоз. Митоз является видимым проявлением общеклеточных преобразований, хотя феноменологически не реализуется оформлением и перемещением ядерных структур, хромосом. Поломку и дислокацию хромосом Бак расценивает как "физиологический ответ на биохимические изменения

- 16 -

среды" /Бак (9), стр. 172; 1956/. Прямо доказательства видоизменения цитоплазмной реакцией клеточных ядер на проникающие излучения представлены Эйлером и Хан (32, 1946), которые установили, что искусственно изолированные ядра тимоцитов теленка, т.е. крайне чувствительных к облучению клеток, выносят колоссальные дозы от 25 000 до 60 000 р (в 40-100 раз больше, чем LD_{100}), не обнаруживая ни физических, ни химических изменений содержащихся в них нуклеопротеидов. В то же время, как показал Дарье (33, 1949) инъекция в нормальную клетку 10^{-4} мл облученной цитоплазмы вызывает пикноз и вакуолизацию ядер, распад ядрышка, фрагментацию хромосом, иначе говоря, типичную картину лучевого повреждения. Роль цитоплазмы подчеркнута в 1957 г. Эррером, Баком и др. (35), изучавшими водоросль, *Acetabularia mediterranea* и установившими большую радиочувствительность цитоплазмного стебля, чем ядродержащего ризоида; Петерс (36) показал на зародышах тритонов возникновение "токсических" продуктов в облученной цитоплазме, которые, проникая затем в ядродержащие бластомеры, вызывали повреждения ядер.

Таким образом, конечный результат клеточного ответа на действие проникающих излучений определяется сложными взаимодействиями ядра и цитоплазмы, а не изолированными реакциями одной ДНК.

Нам, конечно, ясно, что процессы радиобиологической реактивности клеток чрезвычайно сложны; изменения нуклеопротеидов не исчерпывают всего многообразия нарушений структур и метаболизма. Однако изложенный выше материал в сочетании с данными литературы убеждает, что одно из центральных мест в цепи биологических превращений, следующих за актом первичного поглощения ионизирующих излучений, занимают превращения нуклеопротеидов. В работах Олфри и Мирского (38) приведены исключительно интересные факты, свидетельствующие об определенном участии полинуклеотидов ДНК и РНК в аэробном синтезе аденозинтрифосфата. В дополнение ранее известных данных становится очевидным важная роль ДНК и РНК как "кофакторов" обеспечения клетки макроэргическими фосфатами, что в сочетании с их ролью в синтезе белков позволяет глубже понять последствия дезаггрегации нуклеопротеидов и нуклеиновых кислот при действии ионизирующей радиации. Интегрирующая роль нуклеиновых соединений, включенных в наиболее ответственные клеточные органоиды, в пространственной и причинной координации

- 17 -

процессов метаболизма обязывают радиобиологов различных направлений к дальнейшему изучению данной проблемы.

З а к л ю ч е н и е

1. Повреждения нуклеопротеидов различных структур клетки занимают одно из центральных мест в цепи биологических превращений, следующих за актом первичного поглощения ионизирующей радиации. Проникающие излучения избирательно действуют на органоиды клеток, содержащие дезокси- и рибонуклеопротеиды.

2. Относительная радиорезистентность хлоропластов растительных клеток, измеренная по активности фотосинтеза, коррелирует с невысоким содержанием в них нуклеопротеидов; в связи с этим раннимость более молодых листьев выше, чем старых.

3. Повреждаемость рибонуклеопротеидного компонента белкового остова митохондрий (животных клеток) малыми дозами рентгеновых лучей влечет за собой: а) набухание и агглютинацию митохондрий; б) дезорганизацию пространственной координации сосредоточенных в них ферментов; в) прогрессирующее повреждение ядрышка, ядра и эргастоплазмы.

4. Процессы окислительного фосфорилирования, которые резко тормозятся ионизирующей радиацией, возвращаются к норме, если к взвеси митохондрий (печени) добавить высокополимерную ДНК из неповрежденных ядер; деполимеризованная ДНК не снимает угнетения данного ферментного процесса, что указывает на наличие связи между процессами, идущими в ядре и митохондриях облученной клетки.

5. Раннимость клеток проникающими излучениями параллельна функциональным физико-химическим особенностям и нативному состоянию нуклеопротеидов, которые являются одними из важнейших субстратов реактивности как ядерных, так и цитоплазмических структур; в частности, наблюдается соответствие количества свободных фосфорнокислых групп (и поэтому - изoeлектрической зоны) и степени повреждающего действия. При учете конкретных условий, ответные превращения различных органоидов, содержащих нуклеопротеиды (ядро, ядрышко, митохондрии, эргастоплазма) в принципе сравнимы; конечный результат определяется интегрирующими свойствами клетки как целого, подчиненного в свою очередь высшему регулирующему единству организма.

- 18 -

Л и т е р а т у р а

1. Ertter M., Acta radiol., 1954, Suppl., 116, 684
2. Ларионов Л.Ф., Вестн. рентгенологии и радиологии, 1954, № 2, 3; Вопросы радиобиологии, Медгиз, 1956, 268
3. Кузин А.М., Изв. АН СССР. Сер. биол, 1957, № 3, 273
4. Ord M.G., Stocken L.A., Brit. Radiol., 1955, 28, N=339, 279
5. Pinchot G.B., J. Biol. Chem., 1957, 229, 1-37
- 5а. Сисакян Н.М., Одинова М.Е., Биохимия, 1956, 21, 577
6. Критский Г.А., Докл. АН СССР, 1957, 113, 146
7. Bloom W., Histopathology of irradiation from external and internal sources, 1948, New-York.
8. Hollaender A., Radiation biology, 1954-1955, I a, II
9. Baeq Z., P. Alexander, Fundamentals in radiobiology, 1955, London.
10. Астауров Б.Л., Биологический ж., 1937, 6, 1; Ж. общ. биологии, 1947, 8, 441
11. Bloom W., Zirkle R., Science, 1953, 117, 487, Prok. of Inst. Med., Chicago, 1954, 20, N25, 118
12. Неменов М.И., Рентгенотерапия через воздействие на нервную систему, Л., 1950
13. Ливанов М.Н. В кн.: Тезисы Всес. конференции по медиц. радиол. М., 1956
14. Минаев П.Ф., Ж. общ. биологии, 1954, 15, 401
15. Лившиц Н.Н., Тр. Ин-та биофизики АН СССР, 1955, 1, 63, Биофизика, 1956, 1, 221
16. Davison P.F., Conway B., Butler J.A., Progress in biophysics, 1954, 4, 148
17. Кузин А.М. В кн.: Биологическое действие ионизирующих излучений, М., 1956
18. Мейсель М.Н., Кондратьева. В кн.: Вопросы радиобиологии, М.-Л., 1956, 314
- 18а. Мейсель М.Н., Сондак В.А., Биофизика, 1956, 1, 262
19. Семенов Л.Ф. В кн.: Вопросы радиобиологии, М.-Л., 1956
20. Шабадаш А.Л., Докл. АН СССР, 1953, 91, 405; Докл. АН СССР, 1957, 114, 658. В кн.: Вопросы биохимии нервной системы. Киев, АН СССР, 1957; Архив анат., гистол. и эмбриол., 1958, № 1, № 3; В кн.: Радиобиология; Тр. Всес. конференции, 1957, Изд. АН СССР, 1958, 161

- 19 -

21. Fritz-Niggli H., *Naturwissenschaften*, 1956, 49, 425
22. Ларионов Л.Ф. В кн.: Вопросы радиобиологии, М.-Л., 1956, 268
23. Ларионов Л.Ф., Кантин А.В. В кн.: Вопросы радиобиологии, М.-Л., 1956, 280
24. Vendrely R., Vendrely G., *Experientia*, 1949, 5, N28, 327
25. Vendrely R., Boivin A., *Experientia*, 1947, 3, 22
26. Swift H., *Physiol. Zoology*, 1950, 24, N24, 169
27. Kaufmann B., Gay H., Donald M. Mo., Cold spring harbor symposia on quantitative biology, 1950, 14, 370; *J. Cellular and Compar. Physiol.*, 1951, 38, Suppl. N21, 71
28. Alfert M., *Biol. Bull.*, 1952, 103, 145
29. Butler G., *Canad. J. Res. Ser. B.*, 1949, 27, 972
30. Эйдус Л.Х., Каламкарова М.Б., *Биофизика*, 1957, 2 (5)
31. Белозерский А.Н. В кн.: Совещание по белку, АН СССР, 1948; Нуклеопротеиды и полинуклеиновые кислоты растений, МГУ; Дис., 1943; *Вестн. Моск. ун-та.* 1949, 2, 125
32. Euler H., Hahn L., *Acta radiol.*, 1946, Stockholm, 27, 269
33. Duryee W., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1949, 10, 735
34. Цанев Р.Г., Шабаташ А.Л., Докл. АН СССР, 1958, № 5
35. Errera M., Skreb, *Exper. Cell Res.*, 1957, 12, N23; *Vacq. Z.*, Errera M. a. al., *ibid.*, 1957, 13, N21
36. Peters P., *Naturwissenschaften*, 1957, 44, 19
37. Кузин А.М., Сун-Чи, Саенко Г.Н., *Биофизика*, 1958 (в печати)
38. Allfrey V.G., Mirsky A.E., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1957, 43, N27, 589
39. Mirsky A.E., Pollister A.W., *J. Gen. Physiol.*, 1947, 30, 117

-20-

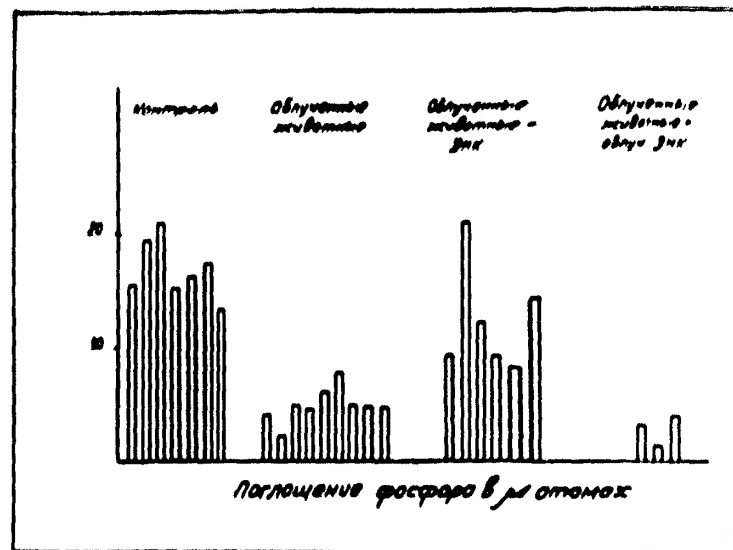


Рис. 1

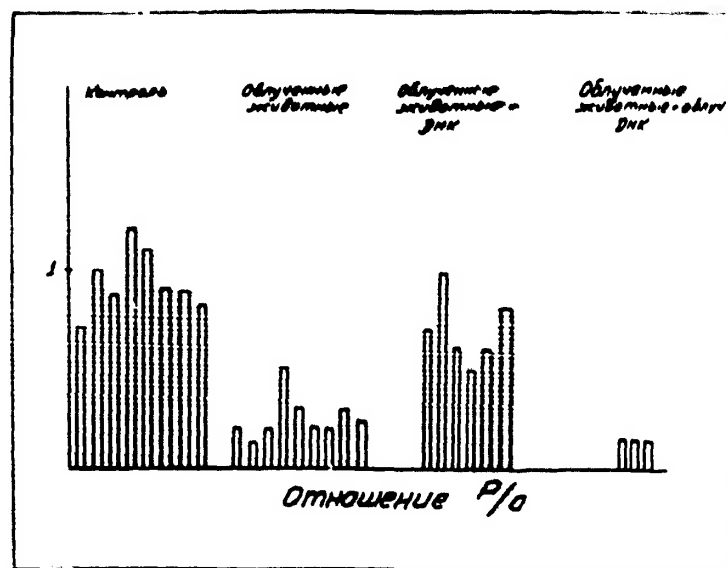


Рис. 2

-21-

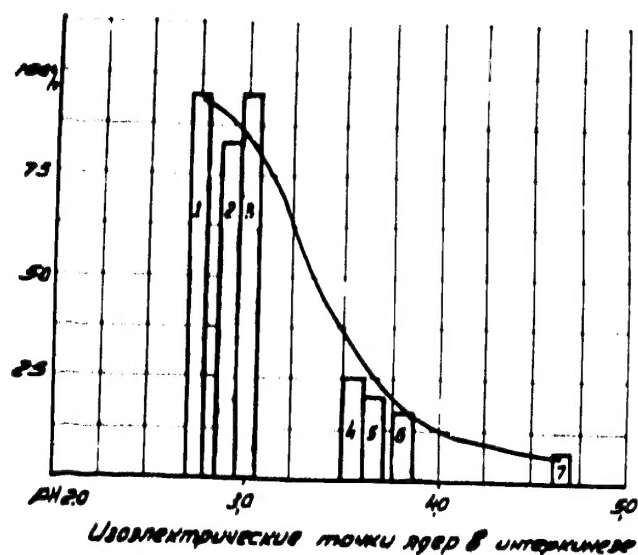


Рис.3. По ординате - процент поврежденных клеток в органах крысы после общего рентгеновского облучения, LD_{100} . По абсциссе - pH изoeлектрических точек ядер клеток в интеркинезе, 1-селезенка (мальпигиевы тельца), 2-эпителий слизистой двенадцатиперстной кишки, 3- тимоциты, 4- нервные клетки ствола мозга, 5-печень, 6 - почка, 7 - фиброциты. Кривая - показатель относительной радиочувствительности клеток

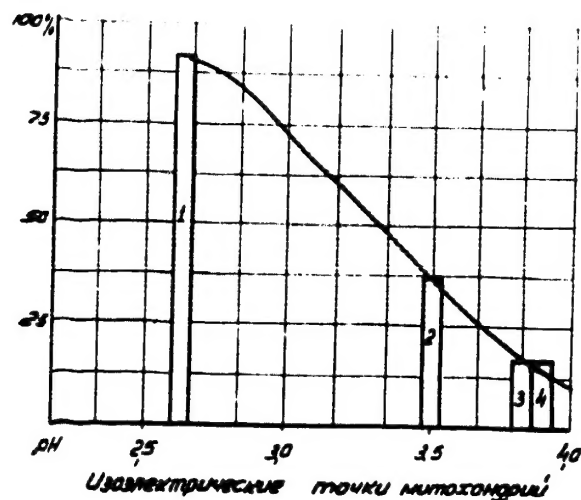


Рис.4. По ординате процент поврежденных клеток в органах котенка после общего рентгеновского облучения, LD_{100} . По абсциссе - pH изoeлектрических точек РНП митохондрий. 1-лимфоциты, 2- нервная клетка, 3- печень, 4 - почка